

- V. G. und G. GHOTTO, *Helv. med. Acta* 25, 235 (1958). — 13. ZAJICEK, J. und N. DATTA, *Acta haemat.* 9, 115 (1953). — 14. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 339, 157 (1964). — 15. GLICK, D., *Biochem. J.* 31, 521 (1937); *J. Biol. Chem.* 130, 527 (1939). — 16. ALLES, G. A. and R. C. HAWES, *J. Biol. Chem.* 113, 375 (1940). — 17. MENDEL, B. and H. RUDNEY, *Biochem. J.* 37, 59 (1943). — 18. BRAUER, W. R. and M. A. ROOT, *Amer. J. Physiol.* 149, 611 (1947). — 19. KALOW, W., *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 215, 370 (1952). — 20. KOELLE, G. B., *Klin. Wschr.* 36, 1043 (1958). — 21. KOELLE, G. B. (editor), *Cholinesterase and anticholinesterase agents. Handbuch der exper. Pharmakologie Bd. XV.* Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963. — 22. ANTOL, W., A. SCHIFRIN und L. TUCHMANN, *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 36, 46 (1937). — 23. FREMONT-SMITH, K., W. VOLIVILES und P. A. WOOD, *J. Lab. a. Clin. Med.* 40, 692 (1952). — 24. VORHAUS, L. J., H. H. SCUDAMORE und R. M. KARK, *Am. J. M. Sci.* 221, 140 (1951). — 25. VORHAUS, L. J. und R. M. KARK, *Am. J. Med.* 14, 707 (1953). — 26. LAMOTTA, R. V., H. M. WILLIAMS und H. J. WETSTONE, *Gastroenterology* 33, 50 (1957). — 27. LANG, W. und G. INTSESULOGLU, *Klin. Wschr.* 40, 312 (1962). — 28. McCANE, R. A., *Proc. Roy. Soc. Med.* 43, 272 (1950). — 29. REINHOLD, J. G., L. G. TOURIGNY, und V. L. YONAN, *Am. J. Clin. Pathol.* 23, 645 (1953). — 30. SCHMIDT, H. W., *Klin. Wschr.* 25, 818 (1947). — 31. CLINE, J. K., R. B. JOHNSON und W. H. JOHNSON, *Southern Med. J.* 41, 374 (1948). — 32. WILLIAMS, H. M., R. V. LAMOTTA und H. J. WETSTONE, *Gastroenterology* 33, 58 (1957). — 33. HAMMER, O., *Ärzt. Forsch.* 15, 381 (1961). — 34. SCUDAMORE, H. H., L. J. VORHAUS II, und R. M. KARK, *J. Lab. Clin. Med.* 37, 860 (1951). — 35. HEINECKER, R. und I. MAYER, *Klin. Wschr.* 95, 340 (1957). — 36. AMMON, R. und F. J. ZAPP, *Klin. Wschr.* 33, 759 (1955). — 37. KALOW, W. und D. R. GUNN, *Pharmakol. a. Exper. Ther.* 120, 203 (1957). — 38. KALOW, W. und K. GENEST, *Canad. J. Biochem. a. Physiol.* 35, 339 (1957). — 39. GROHMANN, W., *Anaesthesist* 6, 136 (1957). — 40. HARRIS, H. und E. B. ROBSON, *Lancet (Lo.)* 218 (1963). — 41. AMMON, R. und K. ZIFF, *Klin. Wschr.* 20, 1177 (1941). — 42. HEIM, F. und D. AMELUNG, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 207, 477 (1949). — 43. ZIFF, H. F., in: Killian, H. (editor): *Lokalanästhesie und Lokalanästhetika*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959. — 44. FREUDENBERG, R. und F. K. REDLICH, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 188, 645 (1938). — 45. MOORE, C. B., R. BIRCHALL, H. M. HORACK und H. M. BATSON, *Am. J. Med. Sci.* 234, 538 (1957). — 46. GROB, D., Ch. 23 in Koelle, G. B. (editor): *Handbuch der exper. Pharmakologie Bd. XV.*, Springer Verlag 1963. — 47. MÜLLER, P. (editor), *DDT*, Vol. I (1955), Vol. II (1959) Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart. — 48. SCHRADER, G., *Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester*. Verlag Chemie G. M. B. H., Weinheim 1963. — 49. WIRTH, W., *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 207, 547 (1949); 217, 144 (1953). — 50. HECHT, G. und W. WIRTH, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 211, 264 (1950). — 51. HOLMSTEDT, B., in Koelle, G. B. (editor), vgl. 21. — 52. WILSON, I. B., in: *The Enzymes*, Vol. IV., 501 (1960), Academic Press, N. Y.-Lo. 1960. — 53. METCALF, R. L., *J. Econ. Entomol.* 44, 883 (1951). *Organic Insecticides*. N. Y.-London, Inc. Publishers 1955. — 54. FRAWLEY, J. P., E. C. HAGAN und O. G. FITZHUGH, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 105, 156 (1952). — 55. HAMBLIN, D. O. und H. F. MARCHAND, *Cholinesterase tests and their applicability in the field*. N. Y., American Cyanamid Company, March 1951; HAMBLIN, D. O. und H. F. MARCHAND, *Ann. Int. Med.* 36, 50 (1952). — 56. HECHT, G., *Dtsch. med. Wschr.* 77, 783 (1952). — 57. PRIBILLA, O., *Arch. f. Toxik.* 15, 210 (1955). — 58. ERDMANN, W. D. und L. LENDLE, *Ergeb. inn. Med. Kinderheilk.* 10, 104 (1958). — 59. DURHAM, W. F. und W. J. HAYES, Jr., *Arch. environm. Hlth.* 5, 21 (1962). — 60. ACKERMANN, H. *Dtsch. Gesd. wes.* 26, 1213 (1964). — 61. KLIMMER, O. R., *Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfungsmittel*. Hundt-Verlag, Hattingen (Ruhr), 1964. — 62. WOLF, H., *Klin. Wschr.* 43, 819 (1965). — 63. BRECHT, K., *Dtsch. med. Wschr.* 72, 445 (1947). — 64. BARNES, J. M. und D. R. DAVIES, *Brit. Med. J.* 2, 316 (1951). — 65. CALLAWAY, S., D. R. DAVIES und J. P. RUTLAND, *Brit. Med. J.* 2, 812 (1951). — 66. MARCHAND, J. F., *J. Am. Med. Assoc.* 149, 738 (1952). — 67. WOLFSIE, J. H. und G. D. WINTER, A. M. A. *Arch. Industr. Hyg.* 6, 43 (1952). — 68. MEYER, A. und W. WILBRANDT, *Helv. Physiol. Acta* 12, 206 (1954). — 69. AUGUSTINSSON, K.-B., *Acta physiol. Scand.* 35, 40 (1955). — 70. FRYER, J. H., R. G. D. STEEL und H. H. WILLIAMS, A. M. A. *Arch. Ind. Hlth.* 12, 406 (1955). — 71. SAILER, S. und H. BRAUNSTEINER, *Klin. Wschr.* 37, 986 (1959). — 72. SHANOR, S. P. und Mitarbeiter, *Am. J. Med. Sci.* 242, 141 (1961). — 73. AUGUSTINSSON, K.-B., in: *Methods of biochemical analysis*, N. Y., Intersc. Publishers, Inc., Vol. 5, 1 (1957). — 74. WITTER, R. F., *Arch. environm. Hlth.* 6, 537 (1963). — 75. WIRTH, W., unveröffentlicht. — 76. MICHEL, H. O., *J. Lab. Clin. Med.* 34, 1564 (1949). — 77. HESTRIN, S., *J. biol. Chem.* 180, 249 (1949). — 78. PILZ, W., *Klin. Wschr.* 43, 1227 (1965). — 79. GANELIN, R. S., *Arizona Medicine* (1964) 710

Prof. Dr. G. Hecht
2401 Lübeck-Brodt

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Prednisolon-21-Hemisuccinat-Natrium und seiner Metaboliten

Von F. WEIST, L. ZICHA und CH. SCHÖTTNER

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen (ehem. Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. N. Henning) und dem Städtischen Krankenhaus Pegnitz (Chefarzt: OMR Dr. W. Mauelsbagen)

(Eingegangen am 30. Juli 1966)

Es wird über die Variation einer dünn-schichtchromatographischen Methode zur Auftrennung und zum semiquantitativen Nachweis eines Steroidgemisches von Prednisolon, Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium und Prednisolon-Acetat berichtet. Die Art der Methode gestattet es, zu einem quantitativen Bestimmungsverfahren ausgebaut zu werden.

A modified, thin layer chromatographic separation and semi-quantitative detection is reported for a steroid mixture, consisting of prednisolone, sodium prednisolone-21-hemisuccinate and prednisolone acetate. This type of method can be converted into a quantitative determination.

Bei der Bearbeitung von zahlreichen Problemen des Stoffwechsels synthetischer Glucocorticoidderivate hat sich die Dünnschichtchromatographie bestens bewährt

(1—4). Zwar wurde dieses spezielle Gebiet von uns früher bereits bearbeitet (2, 4), doch konnten wir nun durch Änderung der Versuchsbedingungen eine weiter-

Tab. 1 Untersuchte Fließmittelsysteme

Fließmittelsystem	Prednisolon- C ₂₁ -OH	R _F -Werte von Prednisolon- acetat	Prednisolon-21- Hemisuccinat-Na
<i>Einfache Entwicklung</i>			
A Äthylacetat : 1,2-Dichloräthan = 80 : 20	0,2	0,45	0,0
B Chloroform : Methanol = 87 : 13	0,45	0,7	0,06
C Chloroform : Methanol : Eisessig = 90 : 10 : 2	0,4	0,8	0,5
D Äthylacetat : 1,2-Dichloräthan : Eisessig = 80 : 20 : 2	0,2	0,5	0,36
<i>Zweifache Entwicklung</i>			
E 1. Fließmittel: D	0,4	0,7	0,5
2. Fließmittel: A			
F 1. Fließmittel: D	0,5	0,75	0,6
2. Fließmittel: B			
G 1. Fließmittel: Methanol : Tetrachlorkohlenstoff = 15 : 85	0,4	0,7	0,42
2. Fließmittel: Chloroform : Diäthyläther : Eisessig = 70 : 20 : 10			

Tab. 2 Farbtonungen von Prednisolon-C₂₁-OH, Prednisolon-C₂₁-acetat und Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium bei verschiedenen Farbreegenzien

Farbreagenzien	Anfärbung	Trocknung	Tageslicht	UV; 365 mμ	UV; 254 mμ
Perchlorsäure, 20-proz. Perchlorsäure, 20-proz. Zink-II-chlorid, ges. Lsg. in Eisessig Orthophosphorsäure, 40-proz. Cer-IV-sulfat-Schwefelsäure (8) Jodreagenz ¹⁾		10 Min. bei 100°	beige dunkelbraun	gelb dunkelbraun	braun schwarz
		20 Min. bei 130—140°	beige braun	graugelb gelbgrün orange	beige grünbraun rostbraun
		föhngetrocknet	dunkelbraun dunkelbraun	—	—

¹⁾ Lsg. I: 8 g Kaliumjodid und 4 g Jod gelöst in etwa 65 ml 90-proz. Methanol; Lsg. II: 38-proz. Salzsäure : Methanol = 2 : 3; 1 Tl. Lsg. I wird mit 2 Tln. Lsg. II gemischt, filtriert und als Sprühreagenz verwendet.

gehende Differenzierung einzelner dünn-schichtchromatographisch nachweisbarer Stoffwechselprodukte erzielen. Die Verwendung einer Kombination verschiedener Fließmittelsysteme erlaubte schließlich die pharmakochemische Prüfung der Fragestellung, warum trotz Applikation höchster Glucocorticoid-Dosen manche Patienten keine Nebenwirkungen im Sinne des *Cushing*-Syndroms aufweisen. Es hat sich hierbei gezeigt, daß dies nicht zuletzt eine Frage der unterschiedlichen Metabolisierung von synthetischen Steroiden ist (6, 7). Im Rahmen dieser methodischen Arbeit soll eine semi-quantitative Bestimmungsmethode für Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium¹⁾ bzw. dessen Metaboliten beschrieben werden, die sich auch für die quantitative Bestimmung dieser Substanzen eignet.

Methodik und Ergebnisse

Wie bei früheren Untersuchungen arbeiteten wir auch hier nach der Originalmethode von STAHL (3, 5). Es kamen 20 × 20 cm DC-Platten, beschichtet mit Kieselgel G in einer Dicke von ungefähr 250 μ zur Anwendung. Die Laufstrecke betrug 15 cm. Es wurden je ein Teil Urin, Duodenalflüssigkeit und Serum mit 3 Teilen 1,2-Dichloräthan 10 Min. geschüttelt, die beiden Phasen im Scheidetrichter getrennt und dieser Vorgang in gleicher Weise noch zweimal wiederholt. Die gesammelten Extraktmengen wurden bei 40° im Vakuum zur Trockene eingengt. Auf eine vorherige Reinigung des Extraktes, etwa durch Ausschütteln mit 0,1N NaOH, konnte zumindest bei der Urinextraktion verzichtet werden. Der trockene Rückstand wurde in 0,5 ml Chloroform gelöst.

Gegenüber der früher geübten Extraktionsmethode mit Chloroform, Diäthyläther oder Butanol konnte durch Verwendung von 1,2-Dichloräthan die quantitative Ausbeute wesentlich verbessert

werden. Außerdem war bei Verwendung von 1,2-Dichloräthan die Neigung zur Emulsionsbildung weniger stark ausgeprägt als bei Chloroform. Schließlich ließ sich auch der zeitliche Aufwand bei der Vakuumreinigung, insbesondere gegenüber dem Butanol-extrakt, stark reduzieren. Bei Diäthyläther als Extraktionsmittel wären die Verhältnisse in dieser Hinsicht zwar noch günstiger, doch ist die Phasentrennung mit Hilfe des Scheidetrichters umständlicher, da die spezifische Dichte von Diäthyläther kleiner als die von biologischen Flüssigkeiten ist. Es muß allerdings bemerkt werden, daß die Wiedergewinnungsrate für manche Metaboliten im Diäthylätherextrakt günstiger war, jedoch wurden auch vermehrt störende Begleitstoffe im Extrakt aufgenommen.

Neben den Reinsubstanzen Prednisolon-C₂₁-OH, Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium und Prednisolon-C₂₁-acetat²⁾ wurden die Extrakte in steigender Menge mittels Blutzuckerpipetten auf DC-Platten aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei aufsteigender Technik in gesättigter Atmosphäre, die semiquantitative Auswertung nach Anfärbung im sichtbaren und filtrierten UV-Licht (3).

Von einer größeren Anzahl von Fließmittelgemischen erwiesen sich die in Tabelle 1 zusammengestellten als brauchbar. Das Fließmittel F fand bevorzugt Anwendung. Die Farbreaktion erfolgte mit Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure-Reagenz (8), das gewisse Vorteile gegenüber anderen Farbreegenzien besitzt. So können im filtrierten UV-Licht bei 365 mμ noch unter 0,1 μg der Prednisolonverbindungen als Reinsubstanz nachgewiesen werden. Die Anfärbung der Fraktionen bei Verwendung verschiedener Farbreegenzien sind der Tabelle 2, die Zeitabhängigkeit der Harnkonzentration der einzelnen Substanzen ist der Abbildung 1 zu entnehmen. Das Chromatogramm der Abbildung 2 zeigt die Auftrennung einzelner Extrakte von fraktioniertem gesammeltem Urin sowie die 3 Reinsubstanzen Prednisolon-C₂₁-OH, Prednisolon-C₂₁-acetat und Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium.

²⁾ Wir danken der Fa. E. Merck AG. für die freundliche Überlassung von Reinsubstanzen.

¹⁾ „Solu-Decortin-H“ der Fa. E. Merck AG., Darmstadt.

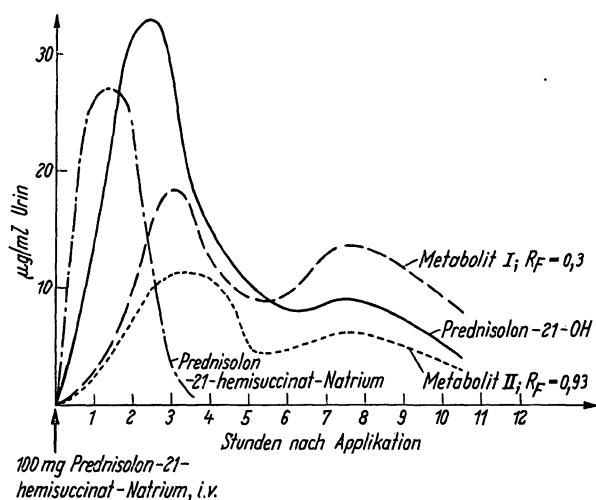


Abb. 1

Ausscheidung von Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium und seiner Metaboliten im Harn nach intravenöser Applikation

Diskussion

Gegenüber den früher angewandten dünnschichtchromatographischen Trennungs- und Nachweisverfahren ergaben sich einige wesentliche Verbesserungen. So hat 1,2-Dichloräthan als Extraktionsmittel gegenüber Chloroform nicht allein den Vorteil, daß die Wiedergewinnungsrate für die untersuchten Substanzen verbessert werden konnte, sondern es ließ sich auch der zeitliche Aufwand bei der Extraktion wesentlich verringern. Durch die Wahl der Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure-Anfärbung war auch gesichert, daß die DC-Platten bei konstantbleibender Intensität der Farbreaktion über Monate aufbewahrt werden können, was wegen der hygroskopischen Reaktion nach einer Phosphorsäurebehandlung der DC-Platten nicht möglich ist. Der wesentliche Fortschritt des nun angewandten Fließmittels besteht darin, daß auch für Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium ein günstiger R_F -Wert erzielt und die 3 in Frage kommenden Substanzen weiter voneinander getrennt werden konnten. Bei dem Fließmittelsystem C lagen die R_F -Werte der einzelnen Substanzen zwar noch günstiger als bei dem System F, doch war ihre Abgrenzung gegenüber Fraktionen, die normalerweise im Urin vorkommenden Komponenten entsprechen, weniger gut möglich.

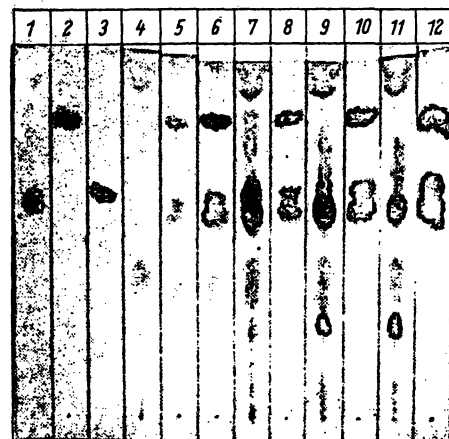


Abb. 2

Chromatogramm

- Spalte 1: 30 µg Prednisolon- C_{21} -OH
- Spalte 2: 30 µg Prednisolon- C_{21} -acetat
- Spalte 3: 30 µg Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium
- Spalte 4: Urinleerwertextrakt
- Spalte 5: 10 µg der drei o. g. Pred.-Verbindg.
- Spalte 6: Urinleerwertextrakt + 30 µg der drei o. g. Pred.-Verbindg.
- Spalte 7: Urinextrakt (Sammelportion 1. Std.)
- Spalte 8: 30 µg der drei o. g. Pred.-Verbindg.
- Spalte 9: Urinextrakt (Sammelportion 2. Std.)
- Spalte 10: 50 µg der drei o. g. Pred.-Verbindg.
- Spalte 11: Urinextrakt (Sammelportion 3. Std.)
- Spalte 12: 100 µg der drei o. g. Pred.-Verbindg.

In der Sammelportion der 1. Std. (Spalte 7) sind von unten nach oben: der Metabolit I; eine auch im Leerwert vorkommende Fraktion; Prednisolon- C_{21} -OH; Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium; einige auch im Leerwert vorkommende Komponenten und der Metabolit II zu erkennen.

In der Sammelportion der 2. und 3. Std. (Spalte 9 und 11) nimmt die Konzentration des Metabolit I, des Prednisolon- C_{21} -OH sowie des Metabolit II zu, während Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium in der 3. Std. nur noch in äußerst geringer Konzentration nachzuweisen ist. (Vgl. auch Abb. 1.)

Mit dieser Methode gelang es, bei Patienten, die Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium in einer Dosierung bis 100 mg i. v. appliziert bekamen, sowohl die injizierte Substanz, den C_{21} -freien-Alkohol, als auch 6 weitere, im Leerwert nicht auftretende Fraktionen, nachzuweisen. Eine dieser Fraktionen verhält sich in der Anfärbung und nach den R_F -Werten wie das C_{21} -Acetat des Prednisolons. Bei Anwendung einer entsprechenden Farbreaktion ist es schließlich möglich, nach Abkratzen der verschiedenen Substanzen und Eluierung aus dem Kieselgel, diese photometrisch zu bestimmen.

Literatur

1. FUNK, F.-W. und L. ZICHA, Med. Exp. 7, 1 (1962). — 2. SCHEIFFARTH, F., L. ZICHA, W.-F. FUNCK und M. ENGELHARDT, Acta endocrin. (K'hn) 43, 227 (1963). — 3. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 4. ZICHA, L., F. SCHEIFFARTH, D. BERGNER und U. EYSELEIN, Acta endocrin. (K'hn) Suppl. 67, 94 (1962). — 5. STAHL, E., Chemikerzeitung 82, 323 (1958). — 6. WEBER, G. und

Mitarbeiter, persönl. Mitteilung. — 7. WEIST, F., L. ZICHA, G. WEBER und CH. SCHÖTTNER, Untersuchungen über verminderte Nebenwirkungen einer Glucocorticoidtherapie bei best. dermatol. Erkrankungen, Endokrinologie (in Vorbereitung). — 8. „Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie“ E. Merck AG Darmstadt.

Dr. F. R. Weist
2400 Lübeck
Kronsfordter Allee 71—73